

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁷ : A61K 39/00, 39/39</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 00/13704 (43) Fecha de publicación internacional: 16 de Marzo de 2000 (16.03.00)</p>
<p>(21) Solicitud Internacional: PCT/CU99/00004 (22) Fecha de la presentación internacional: 3 de Septiembre de 1999 (03.09.99) (30) Datos relativos a la prioridad: 126/98 7 de Septiembre de 1998 CU (07.09.98) (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA [CU/CU]; Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad Habana, C.P. 10600 (CU). (72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): AGUILAR RUBIDO, Julio César [CU/CU]; Avenida 61 No. 7008 e/ 70 y 72, Guanajay, La Habana, C.P. 32200 (CU). MUZIO GONZALEZ, Verena Lucila [CU/CU]; Calle 39 No 871 e/ 24 y 26, Nuevo Vedado, C. Habana C.P. 10600 (CU). GUILLEN NIETO, Gerardo Enrique [CU/CU]; Línea No 6 e/ N y O piso 4, Vedado, C. Habana C.P. 10400 (CU). PENTON ARIAS, Eduardo [CU/CU]; Calle 31 No. 18207 e/ 182 y 184, Apto 49, Cubanacán, Playa, C. Habana C.P. 12100 (CU). LEAL ANGULO, María de Jesús [CU/CU]; Calle 186 No. 3115 e/31 y 33, Playa, C. Habana C.P. 12100 (CU). PICHARDO</p>		<p>DIAZ, Dagmara [CU/CU]; Calle 222 No. 2716, Apto. 32 entre 27A y 29, La Giraldilla La Lisa, C. Habana, C.P. 13600 (CU). IGLESIAS PEREZ, Enrique [CU/CU]; Edificio 25 Apto. 103, Reparto "Camilo Cienfuegos", Habana del Este, C. Habana C.P. 11700 (CU). HERRERA BUCH, Antonieta [CU/CU]; Avenida 31 No. 18207 entre 182 y 184, Playa, C. Habana C.P. 12100 (CU). SANDEZ OQUENDO, Bélquis [CU/CU]; Avenida 25# 10 601 entre 31 y 114, Marianao, C. Habana C.P. 11500 (CU). MUSACCHIO LASA, Alexis [CU/CU]; Calle 128# 7117 entre 71 y 73, Mariel, La Habana C.P. 32100 (CU). QUINTANA VAZQUEZ, Diógenes [CU/CU]; Indalecio Sobrado No. 71, e/ Sol y Vandama, Pinar del Río, Pinar del Río C.P. 20100 (CU). CROMBET MENENDEZ, Lissete [CU/CU]; Calle H#318 entre 13 y 15, Apto. 3 piso 2, Vedado Plaza, C. Habana C.P. 104000 (CU). (74) Mandatario: VAZQUEZ CASTILLO, Mariela; Avenida 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, C. Habana C.P. 10600 (CU). (81) Estados designados: BR, CA, CN, US, Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional. Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben modificaciones.</i></p>
<p>(54) Title: FORMULATION OF NUCLEIC ACIDS AND ACEMANNAN</p>		
<p>(54) Título: FORMULACION DE ACIDOS NUCLEICOS Y ACEMANANO</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>The present invention is related to the medical field, and in particular to the use of new formulations of adjuvants with vaccine antigens. The technical object of the invention is the development of formulations which are capable of potentiating the immune response of the organism to vaccines of nucleic acids. In order to attain this objective, a formulation has been developed which contains as fundamental components the vaccine nucleic acid and acemannan in adequate proportions, in addition to stabilizing and preservative agents. The formulations of the invention are applicable to the pharmaceutical industry as vaccine formulations both for human and animal use.</p>		
<p>(57) Resumen</p>		
<p>La presente invención está relacionada con la rama de la medicina, particularmente con el uso de nuevas formulaciones de adyuvantes con antígenos vacunales. El objetivo técnico que se persigue con la invención propuesta es, precisamente, el desarrollo de formulaciones capaces de potenciar la respuesta inmune del organismo a vacunas de ácidos nucleicos. Para lograr este objetivo se desarrolló una formulación que contiene como componentes fundamentales al ácido nucleico vacunal y al acemanano en proporciones adecuadas, además de estabilizadores y preservos. Las formulaciones de esta invención son aplicables en la industria farmacéutica como formulaciones vacunales tanto para uso humano como veterinario.</p>		

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Malí	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benín	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelanda	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

FORMULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y ACEMANANO

Sector técnico

La presente invención está relacionada con la rama de la medicina, particularmente con el desarrollo de nuevas formulaciones inmuno-
5 potenciadoras que permitan el aumento en cantidad y calidad de la respuesta inmune a antígenos vacunales.

El objetivo técnico que se persigue con la invención propuesta es, precisamente, el desarrollo de formulaciones capaces de potenciar la
10 respuesta inmune del organismo al ácido nucleico vacunal.

Técnica anterior

La utilización efectiva de los adyuvantes actuales para la potenciación de este nuevo tipo de vacunas no es obvia, siendo relativamente reciente el hallazgo de compuestos que potencian al ADN vacunal. Incluso uno de los
15 primeros descubrimientos en el campo de la inmunización con ácido desoxiribonucleico (ADN) fue la ineficiencia de la alúmina, adyuvante de uso general en las vacunas establecidas en el mercado.

El uso de la inmunización directa con ADN comienza a partir del año 1990. Actualmente la investigación se desarrolla tanto en el campo de las
20 vacunas preventivas como en las recientes terapias génicas de células somáticas para el tratamiento de neoplasias malignas, infecciones y enfermedades metabólicas.

Las vacunas de ADN plasmídico tienen muchas ventajas sobre las demás estrategias vacunales. Al igual que los virus atenuados o recombinantes,
25 los vectores plasmídicos posibilitan la activación de células T citolíticas CD8+ (Wang, B. *et al.* 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 4156-4160; Xiang, Z.Q. *et al.* 1994 Virology 199: 132-140). El ADN, una vez inoculado, es capaz de continuar expresando sus genes constituyentes por varios meses y no parece ser patogénico o mutagénico a la célula
30 inyectada, dado que la mayoría de los plásmidos existen de una forma circular, no replicativa y no integrativa (Wolff, J.A. *et al.* 1990 Science

247: 1465). Se ha reportado además que las vacunas de ADN no inducen anticuerpos anti ADN (Xiang, Z.Q. *et al.* 1995 *Virology* 209: 569) y no se han observado en el sitio de la inoculación reacciones inflamatorias serias u otras complicaciones. Por otra parte el ADN no sólo es manipulado
5 fácilmente, sino que puede ser producido de forma barata, en grandes cantidades y con altos niveles de pureza (Tsuji, T. *et al.* 1997 *Eur. J. Immunol.* 27: 782-787).

Aunque los mecanismos involucrados en la inducción y el mantenimiento de la respuesta inmune aun no están claros, se ha usado con éxito la
10 estrategia de coinocular plásmidos que codifican para citoquinas y factores coestimulatorios. Se conoce que hay otros factores que influyen en la respuesta, por ejemplo características propias del vector, que pueden afectar la velocidad de transcripción (Davis *et al.* 1993 *Hum. Gene ther.* 4: 151-159).

15 Actualmente se conoce que los miocitos tienen la capacidad de presentar antígenos asociados a MHC clase I (Pardoll, D.M. and Beckerrieg, A.M. 1995 *Immunity* 3: 165; Cohen, J. 1993 *Science.* 259:1745), pero estas células expresan pobremente las moléculas de MHC clase I y clase II. Para una presentación antigénica eficaz es esencial una señal coestimu-
20 latoria o segunda señal antígeno-independiente para la proliferación de células T y su activación, luego de la interacción antígeno específica del receptor de células T (TCR) y el sistema principal de histocompatibilidad (MHC) (Bluestone, J.A., 1995 *Immunity* 2: 555). Con el uso de plásmidos que codifican para las moléculas coestimulatorias B7-1 y B7-2, se puede
25 expresar en los miocitos una señal coestimulatoria como la que ellos constitutivamente son incapaces de poseer (Hohlfeld, R. y Engel, A.G. 1994 *Immunol Today*, 15: 269), induciendo mayores niveles de proliferación y activación de células T específicas para el antígeno
30 introducido. Aplicado a la inmunidad tumoral, se ha visto que la pobre inmunogenicidad de muchos tumores se debe, parcialmente, a la falta de moléculas coestimulatorias. La transducción de ADN que codifica para

B7-1 o B7-2 en células tumorales ha potenciado la actividad antitumoral (Townsend, S.E. y Allison, J.P. 1993 *Science* 259: 368; Gajewski, T.F., 1996 *J. Immunol.* 156: 465; Yang, G. *et al.* 1995 *J. Immunol.* 154: 2794). Recientemente se ha reportado que la inoculación en un mismo

5 adenovirus de genes que codifican para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y para B7-1, induce una mayor respuesta citotóxica específica para el antígeno viral con respecto a la generada por el gen del antígeno viral solamente (He, X.-S. *et al.* 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 7274). Se ha demostrado también que la coinoculación de ADN

10 del plásmido de expresión de B7-2 junto a ADN vacunal de VIH-1 incrementa la respuesta celular específica para VIH-1, con respecto a la inoculación del ADN de VIH-1 solo. Se encontró además que esta potenciación de la inmunidad celular por B7-2 es dependiente de interferón- γ (IFN- γ) (Tsuji, T. *et al.* 1997 *Eur. J. Immunol.* 27: 782-787).

15 En este mismo trabajo se mostró que la coinoculación de un plásmido que expresa B7-1 no es capaz de potenciar la respuesta celular con respecto al ADN vacunal de VIH-1 solo. Una posible explicación está en que las moléculas B7-2 son inducidas más rápidamente en las células presentadoras de antígenos (APC) que las moléculas B7-1 (Hathcock, K.S.

20 *et al.* 1994 *J. Exp. Med.* 180: 631), por lo que las moléculas B7-2 son más apropiadas para la presentación antigénica inicial. Resultados similares se han obtenido por otros autores, que han demostrado la potenciación de la respuesta citotóxica de linfocitos CD8+ restringidos al MHC clase I (Kim, J.J. *et al.* 1997 *Nature Biotechnology* 15: 641-646).

25 El IFN- γ es una citoquina pleiotrópica que puede potenciar respuestas inmunes mediadas por células T, al regular positivamente la expresión de los determinantes del MHC. El tratamiento de mioblastos en cultivo con IFN- γ ejemplifica lo anterior. En consecuencia se obtienen mioblastos susceptibles a la citólisis por células T y además les permite proveer

30 señales para la proliferación de líneas de células T. Sin embargo, se ha encontrado que la coinyección de dos plásmidos que expresan la proteína

G del virus de la rabia y el IFN- γ no tuvo efecto sobre la respuesta inmune antiviral (Xiang, Z. *et al.* 1995 Immunity 2: 129-135).

Otros estudios han mostrado que el efecto del IFN- γ depende del promotor utilizado. En el caso de los promotores virales, como el promotor temprano del virus de simios 40 (SV-40) o el de las proteínas MHC clase I, se reduce la respuesta inmune para el vector de expresión del antígeno en presencia de IFN- γ . Las respuestas B y T auxiliaadoras al vector que expresa el antígeno bajo el control del promotor de MHC clase II no resultaron afectadas (Xiang, Z. *et al.* 1997 Vaccine Vol 15 (8): 896-898).

El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) también ha sido coinoculado en un plásmido que lo codifica (Xiang, Z. *et al.* 1995 Immunity 2: 129-135). Esta citoquina induce respuestas inmunes primarias (Tao, M.-H. *et al.* 1994 Nature 362: 755-758) por la activación o reclutamiento de células profesionales presentadoras de antígenos (Heufler, C. *et al.* 1988 J. Exp. Med. 167: 700-705).

En 1995, Xiang y colaboradores evidenciaron que el efecto potenciador del plásmido que expresa GM-CSF sobre la respuesta inmune humoral de la proteína G del virus de la rabia, depende de la coinyección de los dos plásmidos. La inoculación de ambos plásmidos por separado con varias horas de diferencia no generó ningún efecto en la magnitud de la respuesta de anticuerpos al virus de la rabia, sugiriendo que tanto la cotransfección de células individuales como la proximidad de la APC a la célula secretora de GM-CSF es crucial, reflejando la actividad local de la citoquina (Xiang, Z. *et al.* 1995 Immunity 2: 129-135).

La potenciación de la respuesta de anticuerpos neutralizantes que se observa por coinoculación con el plásmido que expresa GM-CSF refleja el efecto primario de esta citoquina sobre la respuesta de células T auxiliaadoras, que a su vez resulta en un incremento en la activación de células B antígeno específicas. En experimentos con líneas celulares dependientes de citoquinas, la ausencia de respuesta a IL-4 indica que las vacunas de ADN inducen principalmente células T auxiliaadoras Th1,

como se mostró previamente, y que la citoquina GM-CSF potencia este patrón de respuesta (Xiang, Z. *et al.* 1995 Immunity 2: 129-135).

Una citoquina de mucha importancia inmunomoduladora es, sin dudas, la IL-12. Se ha demostrado que el plásmido de expresión de la IL-12
5 coinoculado junto al que codifica para una proteína de VIH-1, potencia la inmunidad mediada por células específica para VIH-1. Aunque los mecanismos involucrados en la inducción y mantenimiento de la respuesta inmune no están claros, este tipo de estrategia puede ser fructífera (Takashi, T. *et al.* 1997 J. Immunol. 158: 4008-4013).

- 10 En adición a sus propiedades adyuvantes, el tratamiento de los pacientes VIH-positivos con esta citoquina retarda la progresión a la enfermedad. Hay pacientes que logran normalizar la hiporespuesta de células T al virus y restablecen su producción de IFN- γ por monocitos de sangre periférica (Clerici, M. *et al.* 1993 Science 262: 1721), así como la actividad
15 citotóxica mediada por células *natural killer* (NK) (Chehimi, J. *et al.* 1992 J. Exp. Med. 175: 789). También se ha observado que la IL-12 inhibe la apoptosis de células CD4+ (Radrizzani, M. *et al.* 1995 Cell. Immunol. 161: 14).

- En estudios de coadministration de plásmidos que codifican IL-6 y
20 hemaglutinina, inoculados con la pistola génica Accell, se confirió protección al reto con el virus de la influenza en ratones. Los ratones que recibieron el ADN del plásmido que expresa hemaglutinina sólo exhibieron un aclaramiento acelerado del reto viral, pero no se protegieron de la infección, mientras que a los que se coinoculó el plásmido de la IL-6 no se
25 les detectó virus en los pulmones luego del reto (Larsen, D.L. *et al.* 1998 J. Virol. 72 (2): 1704-1708).

- La creación de un sistema de envío genético eficiente es un reto de la terapia génica. Recientemente se ha estudiado la asociación y estabilidad de ADN plasmídico, que codifica para ovoalbúmina, con partículas
30 poliméricas de un tamaño que alcanza las micras: microesferas biodegradables de ácido poliláctico y coglicólico, poli DTH-carbonato (un

- pseudopoliaminoácido) y partículas de poliestireno de alrededor de 1µm. Las mismas difieren en carga eléctrica e hidrofobicidad y han sido ensayadas tanto para la inmunización mucosal como parenteral. El ADN se adsorbió tanto sobre las partículas biodegradables como sobre las que
- 5 no lo son. Los resultados encontrados demostraron que se obtienen respuestas superiores luego de la administración de ADN asociado a partículas con respecto a la inoculación de ADN libre. La inoculación intranasal (i.n.) e intramuscular (i.m.) de ADN en sistemas particulados genera respuestas similares a nivel sérico (Alpar, H.O. *et al.* 1997
- 10 Biochemical Society Transactions 25: 337S).
- El efecto adyuvante del ubenimex (UBX), un inmunomodulador antican- cerígeno, sobre una vacuna anti-VIH basada en ADN, se evaluó en un modelo murino. El UBX se coinoculó intramuscularmente en ratones balb/c y se generaron respuestas de anticuerpos IgG entre 10^3 y 10^5
- 15 veces mayores a aquellos obtenidos sin el UBX. Este compuesto también generó una mayor respuesta tanto de hipersensibilidad retardada (DTH) específica contra VIH, como de linfocitos T citotóxicos (CTL), medida por el método de liberación de ^{51}Cr . El perfil de citoquinas de los linfocitos reestimulados mostró que el UBX eleva los niveles de IL-2 e IFN- γ y
- 20 disminuye la producción de IL-4. El análisis de las subclases de inmunoglobulinas mostró una elevación en los niveles de IgG2a en el grupo adyuvado con UBX, así como una disminución en la síntesis de IgG1 e IgE. El UBX puede tener uso clínico dada su baja inmunogenicidad y toxicidad, actuando como un adyuvante para vacunas de ADN (Sasaki,
- 25 S. *et al.* 1998 Clinical and Experimental Immunology 111-1: 30-35).
- El uso de mananos recubriendo estructuras químicas como N t-butyl N' tetradecylamino-propionamidina (diC14 amidina), potenció la respuesta inmune antígeno específica a un plásmido que contenía el gen de la proteína gp160 del virus del SIDA. El recubrimiento del diC14 con el
- 30 manano aumentó significativamente la respuesta DTH antígeno específica inducida por el ADN. La actividad CTL también fue marcadamente

potenciada por esta mezcla. El efecto inmunomodulatorio se inhibió cuando se trató la mezcla con anticuerpos anti IFN- γ *in vivo*, lo cual evidencia que el IFN- γ juega un papel importante en la inducción de la inmunidad celular generada por las vacunas de ADN. El resultado del análisis del isotipo de las inmunoglobulinas antígeno específicas, así como la medición de citoquinas, mostró que el ADN vacunal incorporado en la amidina diC14 recubierta de manano generó una respuesta Th1 (Sasaki, S. *et al.* 1997 Eur. J. Immunol. 27 (12): 3121-3129).

Se ha evaluado también la respuesta inmune a la vacunación con ADN vía i.n. e i.m. contra VIH-1 usando monofosforil-lípido A (MPL-A) como adyuvante. Ambas rutas de inmunización generaron niveles similares de inmunidad celular, pero la respuesta de IgA secretada a nivel de intestino fue mayor en el caso de los animales inmunizados por ruta intranasal. El MPL-A demostró su adyuvanticidad por ambas rutas (Sasaki, S. *et al.* 1998 Infection and Immunity 66 (2): 823-826).

Un elemento de importancia en la determinación del tipo de respuesta inmune lo constituye el compartimento celular donde se expresa el antígeno codificado por el vector plasmídico. En un estudio con las formas secretada, anclada a membrana o intracelular de la glicoproteína D de herpesvirus bovino-1, que induce consistentemente títulos de anticuerpos séricos neutralizantes, se pudo evidenciar una diferencia en la velocidad de seroconversión. Los ratones que fueron inmunizados con la forma auténtica -anclada a membrana-, así como los que se correspondían a la forma secretada, seroconvirtieron antes que los inmunizados con la forma citosólica de la glicoproteína D. Durante las primeras 14 semanas, los ratones que recibieron la forma auténtica desarrollaron los niveles más altos de IgG, mientras que los ratones que recibieron la forma citosólica tuvieron la menor media geométrica. Estos últimos, generaron medias de títulos que excedieron los otros grupos a las 23 semanas del inicio de la inmunización. El perfil de citoquinas de linfocitos de bazo fue característico de una respuesta Th1, con producción de IFN- γ sin

importar la forma del antígeno. Para la forma secretada, el isotipo de IgG por ELISA no correlacionó con este perfil de citoquinas (Lewis P.J. *et al.* 1997 Vaccine 15 (8): 861-864).

La influencia de la localización celular en la efectividad de la
5 inmunización con ADN también se ha estudiado usando ovoalbúmina como modelo. Se evaluaron tres formas de ovoalbúmina: citoplasmática, anclada a membrana y secretada, siendo la variante secretada la que generó más IgG específica, en un rango de 10 a 100 veces. Sorprendentemente, se observó una mayor respuesta citotóxica en la forma secretada
10 que en la anclada a membrana y la citoplasmática (Boyle J.S. *et al.* 1997 International Immunology 9, (12): 1897-1906).

Trabajos recientes han demostrado que la ruta de inmunización influencia la magnitud de la respuesta. La inyección intradérmica (i.d.) resultó más eficiente que la vía i.m. en la generación de anticuerpos en
15 ratones inmunizados tanto con proteínas como con ADN. Aunque por inmunizaciones con ADN se obtuvieron niveles de IgG total similares a los generados por los controles de proteína soluble, la avidez de los anticuerpos anti-ovoalbúmina fue 100 y 1000 veces mayor por vía intramuscular e intradérmica respectivamente. El examen de la respuesta
20 de subclases de IgG evidenció un predominio de la subclase IgG2a en el caso del plásmido inoculado por vía i.m., coincidiendo con una elevada producción de IFN- γ , mientras era predominante la IgG1 en el caso del plásmido y las proteínas solubles inoculadas por vía i.d., coincidiendo con una producción detectable de IL4. La respuesta CTL se obtuvo sólo
25 después de la inmunización con ADN. En las dos primeras semanas la vía i.d. produjo la respuesta más fuerte, pero esta disminuyó hasta el nivel de la i.m. con posterioridad. De aquí que la inmunización con ADN puede diferir de la inmunización con proteínas por su capacidad de generar una rápida respuesta CTL y por la mayor avidez de los anticuerpos que se
30 producen, ambos parámetros importantes en el diseño de vacunas (Boyle J.S. *et al.* 1997 PNAS 94 (26): 14626-14631).

Muchos carbohidratos complejos de origen natural estimulan las células del sistema inmune y reticuloendotelial (Davis, S.E. 1975 Am. Chem. Soc. Sympos. Series 15, Jeanes A. Hodge J. Eds. Am. Chem. Soc. Washington D.C.). Entre ellos están los polímeros de plantas y hongos como son los glucanos, dextranas y lentinanos -todos ellos polímeros de glucosa- y los mananos, entre los que se encuentran glucomananos y galactomananos. También se encuentran los levanos y xylanos (Tizard, I.R. *et al.* 1989 Mol. Biother 1: 290-296). La actividad de muchos de estos poliglicanos sobre los macrófagos -que tienen receptores de glucanos y mananos- incluye la inducción de fagocitosis y secreción de citoquinas, leucotrienos y prostaglandinas. El lentinano, un glucano común de las setas, estimula la respuesta celular y de anticuerpos a eritrocitos de carnero, mientras el levano es mitogénico para células B, y activador de macrófagos (Simon, P.M. 1994 Exp. Opin. Invest. Drugs 3 (3): 223-239).

El acemanano es un manano compuesto por manosas con O-acetilaciones en aproximadamente 8 de cada 10 restos. Se extrae como componente mayoritario de la sustancia mucilagínosa o gel de la hoja de *Aloe barbadensis* Miller, planta medicinal usada desde la antigüedad. Distintas pruebas *in vitro* indican que los mananos activan monocitos y macrófagos, induciendo la elaboración de interferón- γ , factor- α de necrosis tumoral, factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos, IL-1 β e IL-6 (Peng, S.Y. *et al.* 1991 Mol. Biother. 3: 79-87). El acemanano potencia la generación de linfocitos T citotóxicos (Womble, D. *et al.* 1988 Int. J. Immuno-pharmacol. 10: 967-974), la actividad citotóxica de células NK (Marshall G.D. *et al.* 1993 J. Immunol. (part II) 150: Abstr 1381) y también, modestamente, la alorespuesta humana *in vitro*.

El aumento de la actividad citotóxica y la secreción de IFN- γ apoya el uso terapéutico como antiviral y antitumoral del acemanano. Se ha evidenciado su actividad antiretroviral en el caso del virus de la leucemia felina (Sheets, M.A. *et al.* 1991 Mol. Biother. 3: 41-45). Recientemente se han solicitado patentes para el uso del acemanano como adyuvante para

vacunas. (McAnalley, B.H. EP 0 619 117 A2; Nordgrem, R.M. WO 93/14195; Aguilar, J.C. *et al.* CU27/1997) pero en ninguno de los tres casos se protege el uso del acemanano en formulaciones vacunales conteniendo ADN como antígeno o alguna formulación con un ácido nucleico en particular.

Uno de los principales problemas de las vacunas basadas en ácidos nucleicos en la actualidad es la pobre generación de anticuerpos. La forma más comúnmente utilizada para solucionar este problema es la introducción de compuestos que provocan daño muscular, como pequeñas proporciones de compuestos procedentes de venenos de serpientes, y la posterior inoculación del ADN varios días después en el músculo que se encuentra en estado regenerativo. La respuesta luego de la inyección con ADN en músculo normal no es tan buena como en músculo en estado regenerativo, necesitandose un desarrollo práctico en este aspecto para que la vacunación con ADN se convierta en una alternativa realista a la vacunación clásica (Davis, H.L. *et al.* 1994 Vaccine 12 (16): 1503-1509).

Descripción detallada de la invención

En el trabajo objeto de la presente invención se reporta por primera vez una formulación vacunal cuyos componentes fundamentales son el acemanano y el ácido nucleico vacunal en proporciones adecuadas.

Esta formulación es novedosa por la potenciación de la respuesta que se genera al unir ambos componentes.

Los resultados aquí presentados avalan la introducción de estas formulaciones vacunales para la inmunoprofilaxis e inmunoterapéutica de enfermedades causadas preferentemente por patógenos intracelulares y cáncer.

En la actualidad los mecanismos de acción del acemanano y otros polisacáridos inmunoestimulantes aun no están esclarecidos totalmente. Un mecanismo propuesto involucra a los macrófagos y células

dendriticas, que poseen receptores específicos para patrones antigénicos presentes en la superficie de los patógenos, discriminando así entre lo que es "peligroso" y lo que no lo es. De acuerdo a esto se genera, en el sitio de la inoculación sistémica, una fuerte monocitemia.

- 5 La consistencia viscosa del acemanano lo convierte en un *vehículo activo* que incrementa la permanencia del antígeno en el sitio de inoculación. No se descartan otras actividades como la inducción de citoquinas, la activación de mecanismos de fagocitosis, el reclutamiento de distintas poblaciones de células del sistema inmunológico y el incremento de la
- 10 actividad presentadora de antígenos.

- La formulación objeto de esta invención presenta, de acuerdo al tamaño de la especie a inmunizar un volumen de 0.01 hasta 5mL y una dosis de 0.001 a 5mg de ácido nucleico. La dosis de acemanano se encuentra en un rango de concentraciones de 0.01mg/mL hasta 0.5 mg/mL de hexosas
- 15 equivalente a un rango de hasta 5mg/mL de peso liofilizado, en un volumen de 0.01 a 5mL de acuerdo con la especie.

- La baja reactogenicidad del acemanano con respecto a los adyuvantes de nueva generación y la respuesta T independiente para el propio adyuvante son otras características que hacen atractiva a esta formulación.

20

EJEMPLOS DE REALIZACION

Ejemplo 1:

- Con el objetivo de evaluar la actividad inmunopotenciadora del acemanano sobre plásmidos, para su utilización en vacunas de ADN, se
- 25 realizó un esquema de inmunización por vía intraperitoneal en ratones machos Balb/c de 8 a 12 semanas de vida. El plásmido utilizado posee el promotor de citomegalovirus y codifica para la proteína β -galactosidasa. La actividad inmunopotenciadora se cuantificó por ensayo inmuno-
- 30 enzimático (ELISA) para la determinación de la respuesta de IgG anti- β -

galactosidasa en suero. Las inoculaciones se realizaron los días 0, 15 y 30. Las extracciones fueron los días -2 (preinmune), 45, 90 y 120.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student: $p < 0.05$ se consideró diferencia significativa.

- 5 Se demostró, con el uso de acemanano junto al plásmido pCMV β gal, que es posible obtener respuestas de anticuerpos séricos anti β -galactosidasa significativamente superiores a las obtenidas por el plásmido inoculado en PBS. En general, los grupos inoculados con acemanano intraperitonealmente (grupos 4 y 5) se diferenciaron significativamente de
- 10 los que no lo tenían y fueron inoculados por la misma vía (grupos 2 y 3). La diferencia que se generó el día 45 en el grupo donde se incorporó el oxalato de calcio a una concentración de 0.5mg/mL (grupo 4) no se mantuvo los días 90 y 120 (figura 1).

- La inoculación del plásmido se realizó sin preparación previa del músculo,
- 15 por lo que se encontraba en estado normal. Esto pudiera explicar por qué los títulos de anticuerpos son bajos cuando se inocula el plásmido en PBS por vía intramuscular (grupo 1).

Ejemplo 2:

- 20 Con el objetivo de demostrar la actividad inmunopotenciadora por vía intramuscular, se preparó una formulación del polisacárido acemanano y el plásmido pCMV β gal, que se administró intramuscularmente a un grupo de 8 ratones. Como control se administró la misma cantidad de plásmido en PBS (figura 2).

- 25 El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student: $p < 0.05$ se consideró diferencia significativa.

- Se demostró, con la formulación para uso intramuscular de acemanano junto al plásmido pCMV β gal (grupo 1), que es posible obtener respuestas de anticuerpos séricos anti β -galactosidasa significativamente superiores
- 30 a las obtenidas por el plásmido inoculado por la misma vía en PBS (grupo 2).

En este experimento tampoco se realizó una preparación previa o daño muscular con el fin de inducir un estado de regeneración, por lo que el músculo se encontraba en su estado normal.

5 **Ejemplo 3:**

Con el objetivo de demostrar la actividad inmunopotenciadora por vía intramuscular e intraperitoneal, se preparó una formulación del polisacárido acemanano y el plásmido pAEC-M7CR2, que se administró intramuscular e intraperitonealmente a grupos de 8 ratones. La proteína
10 codificada por este plásmido se corresponde con un polipéptido recombinante quimérico que porta regiones del virus del SIDA (VIH-1) Como control se administró la misma cantidad de plásmido en PBS por ambas vías (figura 3) y además, se inoculó el plásmido parental -que no codifica la proteína.

15 El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student: $p < 0.05$ se consideró diferencia significativa.

Se demostró, con la formulación acemanano 0.35mg/mL + plásmido 100µg por dosis de 100µL para ambas rutas, que es posible obtener respuestas de anticuerpos séricos anti CR2 significativamente superiores
20 a las obtenidas por el plásmido inoculado por la misma vía en PBS (grupo 2).

En este experimento tampoco se realizó una preparación previa o daño muscular con el fin de inducir un estado de regeneración, por lo que el músculo se encontraba en su estado normal.

25

Ejemplo 4:

Con el objetivo de evaluar la actividad inmunopotenciadora del acemanano sobre complejos (plásmido-proteína) inoculados por vía mucosal, se realizó un esquema de inmunización por vía intranasal en
30 grupos de 7 ratones hembras Balb/c de 6 a 8 semanas de vida. El plásmido utilizado posee el promotor de citomegalovirus y codifica para la

proteína β -galactosidasa. Este plásmido se acompañó con la proteína Opc de *Neisseria meningitidis* generando complejos de un tamaño menor de 5 μ m. La actividad inmunopotenciadora se cuantificó por ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la determinación de la respuesta de IgG anti- β -galactosidasa en suero. Las inoculaciones se realizaron los días 0, 14, 28 y 42. La extracción se realizó el día 56.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student: $p < 0.05$ se consideró diferencia significativa.

Se demostró, con el uso de acemanano junto al complejo plásmido pCMV β gal-proteína Opc, que es posible obtener respuestas de anticuerpos séricos anti β -galactosidasa significativamente superiores a las obtenidas por los complejos plásmido pCMV β gal-proteína Opc sin el PS, 15 días después de culminado el esquema de inmunización.

15 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de 3 dosis (0, 15 y 30 días). Extracciones a los 45, 90 y 120 días. En todos los grupos se inocularon 100 μ g de plásmido en un volumen de 100 μ L. El grupo 1 se inoculó intramuscularmente, los restantes grupos se inocularon vía intraperitoneal.

20 Figura 2. Esquema de 3 dosis (0, 15 y 30 días). La extracción se realizó el día 45. En los dos grupos se inocularon 100 μ g de plásmido en un volumen de 100 μ L. Ambos grupos se inocularon intramuscularmente.

Figura 3. Esquema de 5 dosis (0, 21, 44, 64 y 76 días). La extracción se realizó el día 92. En todos los grupos se inocularon 100 μ g de plásmido en un volumen de 100 μ L. Las rutas de inmunización fueron intramuscular (grupos 1-3) e intraperitoneal (grupos 4 y 5).

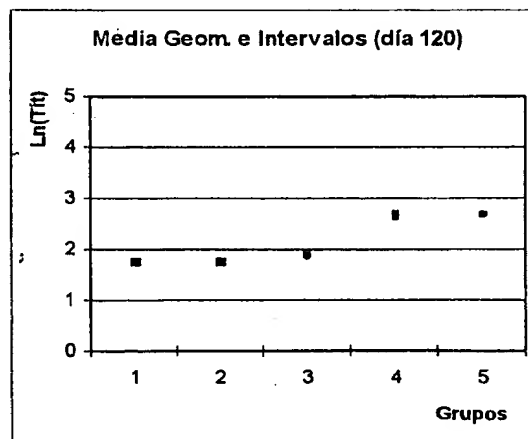
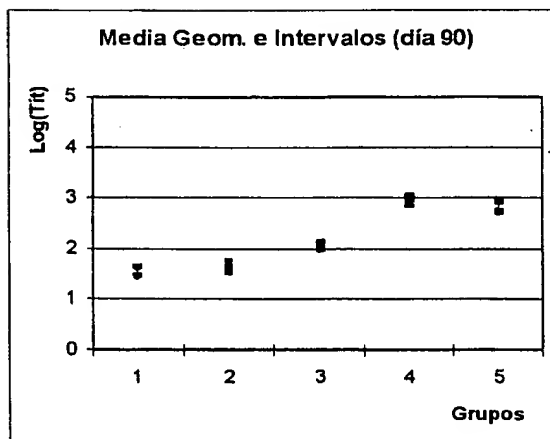
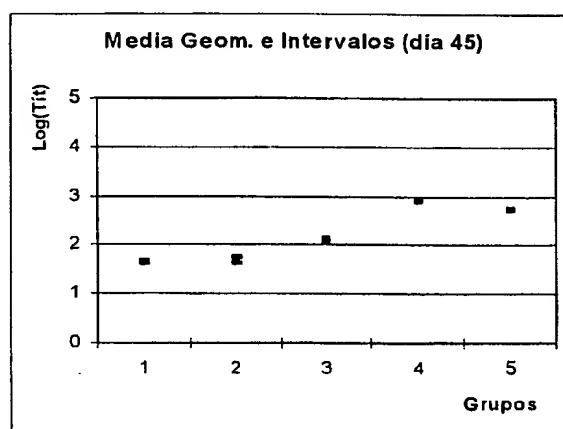
Figura 4. Esquema de 4 dosis (0, 14, 28, 42 días). La extracción se realizó el día 56. En todos los grupos se inocularon 100 μ g de plásmido en un volumen de 50 μ L. Las rutas de inmunización fueron intramuscular e intranasal.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación vacunal de ácidos nucleicos y acemanano caracterizada
5 porque el ácido nucleico puede estar libre, adsorbido o encapsulado en
sistemas de envío de antígenos particulados donde el acemanano potencia
su respuesta inmune.
2. Una formulación vacunal de ácidos nucleicos y acemanano de acuerdo
a la reivindicación 1 caracterizada porque el acemanano se encuentra en
10 un rango de concentraciones de hasta 0.5 mg/mL hexosas equivalente a
un rango de hasta 5mg/mL de peso liofilizado, en un volumen de 0.01 a
5mL de acuerdo con la especie.
3. Una formulación vacunal de ácidos nucleicos y acemanano de acuerdo
a la reivindicación 1 caracterizada por que el ácido nucleico se encuentra
15 en un rango de dosis de 0.001 a 5 mg.
4. Una formulación de ácidos nucleicos y acemanano de acuerdo a la
reivindicación 1 caracterizada porque puede ser utilizada con fines
terapéuticos.
5. Una formulación de ácidos nucleicos y acemanano de acuerdo a la
20 reivindicación 1 caracterizada porque puede ser utilizada con fines
preventivos.
6. Una formulación de ácidos nucleicos y acemanano de acuerdo a la
reivindicación 1 caracterizada porque puede ser administrada por vía
sistémica.
- 25 7. Una formulación de ácidos nucleicos y acemanano de acuerdo a la
reivindicación 1 caracterizada porque puede ser utilizada administrada por
vía mucosal.

Primer Esquema

1-100 μ g ADN/ PBS 1X	IM
2-100 μ g ADN/ PBS 1X	IP
3-100 μ g ADN/ OxCa (0.5mg/mL)	IP
4-100 μ g ADN/ OxCa (0.5mg/mL)+acemanano (3mg/mL)	IP
5-100 μ g ADN/ acemanano (3mg/mL)	IP

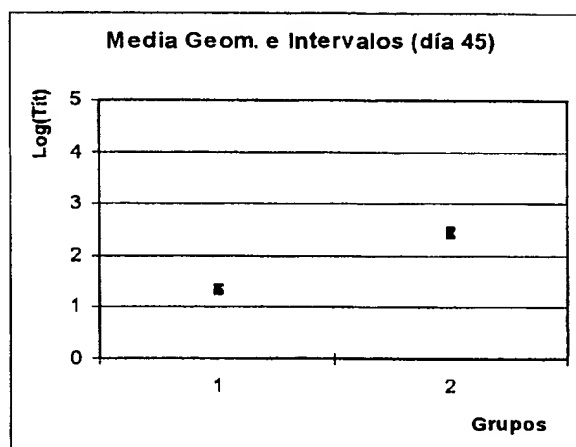
**Figura 1**

Segundo Esquema1-100 μ g ADN/ PBS 1X

IM

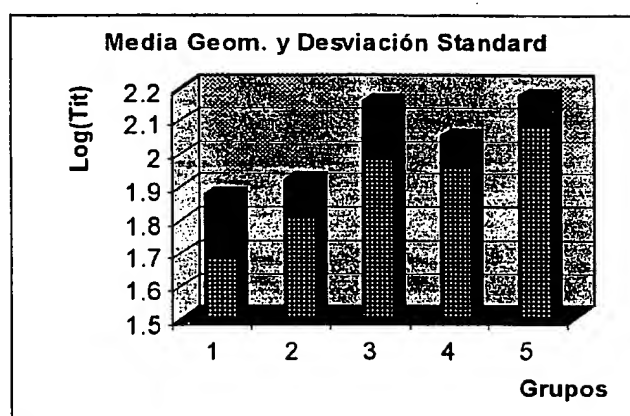
2-100 μ g ADN/ acemanano (3mg/mL)

IM

**Figura 2**

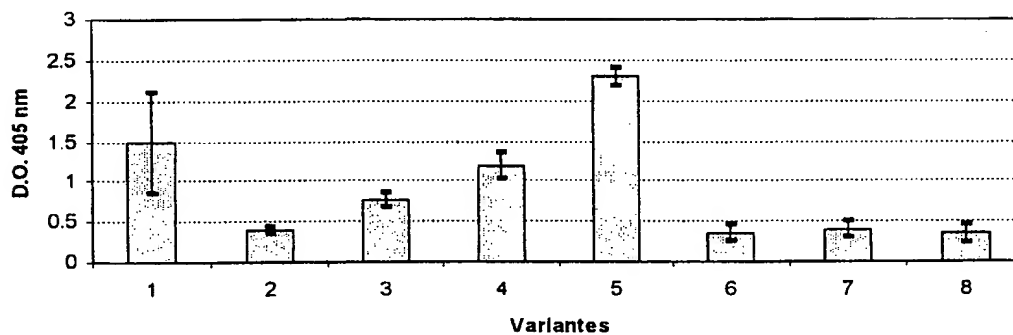
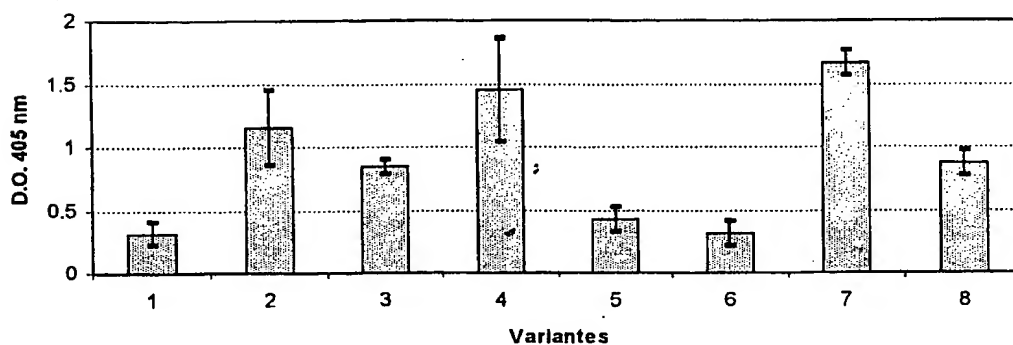
Tercer Esquema:

1-100µg pEACM7 (parental)/PBS	IM
2-100µg pEACM7CR2/PBS	IM
3-100µg pEACM7CR2/Acemanano 3mg/mL	IM
4-100µg pEACM7CR2/PBS	IP
5-100µg pEACM7CR2/Acemanano 3mg/mL	IP

**Figura 3**

Cuarto Esquema

- | | |
|---|----|
| 1- 100µg ADN/ PBS 1X | IM |
| 2- 200µg Opc/ PBS 1X | IN |
| 3- 100µg ADN/ 200µg Opc | IN |
| 4- 100µg ADN/ 200µg Opc +acemanano (3mg/mL) | IN |
| 5- Control positivo | |
| 6- Control negativo | |
| 7- mAb 279, 5C | |
| 8- mAb 154, D-11 | |

ELISA vs β -gal**ELISA vs OpC**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/CU 99/00004

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/00 A61K39/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93 14195 A (SOLVAY ANIMAL HEALTH INC) 22 July 1993 (1993-07-22) the whole document	1-7
A	EP 0 619 117 A (CARRINGTON LAB INC) 12 October 1994 (1994-10-12) the whole document	1-7
A	SASAKI S. ET AL: "Human immunodeficiency virus type-1-specific immune responses induced by DNA vaccination are greatly enhanced by mannan-coated diC14-amidine" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 27, 1997, pages 3121-3129, XP000867270 cited in the application the whole document	1-7
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 January 2000

Date of mailing of the international search report

28/01/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Fernandez y Branas, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/CU 99/00004

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SASAKI S. ET AL: "Adjuvant effect of Ubenimex on a DNA vaccine for HIV-1" CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 111, January 1998 (1998-01), pages 30-35, XP000867267 the whole document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No.

PCT/CU 99/00004

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9314195 A	22-07-1993	AU 3478393 A	03-08-1993
		EP 0626008 A	30-11-1994
		JP 7506565 T	20-07-1995
		ZA 9300216 A	18-08-1993
EP 0619117 A	12-10-1994	US 5106616 A	21-04-1992
		AT 115405 T	15-12-1994
		AU 637985 B	17-06-1993
		AU 4319489 A	05-03-1990
		CA 1336581 A	08-08-1995
		DE 68920019 D	26-01-1995
		DE 68920019 T	20-04-1995
		EP 0382840 A	22-08-1990
		EP 0857485 A	12-08-1998
		EP 0965345 A	22-12-1999
		JP 2888249 B	10-05-1999
		JP 3501624 T	11-04-1991
		W0 9001253 A	22-02-1990
		US 5443830 A	22-08-1995
		US 5441943 A	15-08-1995
		US 5468737 A	21-11-1995
		US 5786342 A	28-07-1998
		US 5587364 A	24-12-1996
		US 5703060 A	30-12-1997
		US 5773425 A	30-06-1998
		US 5780453 A	14-07-1998
		US 5118673 A	02-06-1992
		US 5308838 A	03-05-1994

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU 99/00004

A. CLASIFICACION DE LA INVENCION

Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	WO 93 14195 A (SOLVAY ANIMAL HEALTH INC) 22 July 1993 (1993-07-22) todo el documento	1-7
A	EP 0 619 117 A (CARRINGTON LAB INC) 12 October 1994 (1994-10-12) todo el documento	1-7
A	SASAKI S. ET AL: "Human immunodeficiency virus type-1-specific immune responses induced by DNA vaccination are greatly enhanced by mannan-coated diC14-amidine" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 27, 1997, paginas 3121-3129 XP000867270 citado en el documento todo el documento	1-7

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

- * Categorías especiales de documentos citados:
- "A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente
- "Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional
18 enero 2000 (18.01.2000)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
28/01/2000

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

Funcionario autorizado

Facsímil N° Oficina Europea de Patentes

Teléfono N°

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU 99/00004

Documento de patente citad en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9314195 A	22-07-1993	AU 3478393 A	03-08-1993
		EP 0626008 A	30-11-1994
		JP 7506565 T	20-07-1995
		ZA 9300216 A	18-08-1993
EP 0619117 A	12-10-1994	US 5106616 A	21-04-1992
		AT 115405 T	15-12-1994
		AU 637985 B	17-06-1993
		AU 4319489 A	05-03-1990
		CA 1336581 A	08-08-1995
		DE 68920019 D	26-01-1995
		DE 68920019 T	20-04-1995
		EP 0382840 A	22-08-1990
		EP 0857485 A	12-08-1998
		EP 0965345 A	22-12-1999
		JP 2888249 B	10-05-1999
		JP 3501624 T	11-04-1991
		WO 9001253 A	22-02-1990
		US 5443830 A	22-08-1995
		US 5441943 A	15-08-1995
		US 5468737 A	21-11-1995
		US 5786342 A	28-07-1998
		US 5587364 A	24-12-1996
		US 5703060 A	30-12-1997
		US 5773425 A	30-06-1998
		US 5780453 A	14-07-1998
		US 5118673 A	02-06-1992
		US 5308838 A	03-05-1994

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU 99/00004**C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES**

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	SASAKI S. ET AL: "Adjuvant effect of Ubenimex on a DNA vaccine for HIV-1" CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 111, January 1998 (1998-01), paginas 30-35, XP000867267 todo el documento <hr/>	1-7